

# Media Medika Muda

Copyright©2016 by Medical Faculty of Diponegoro University

Volume 1, Nomor 3

ARTIKEL ASLI

September – Desember 2016



## UJI INTRACELLULAR KILLING TERHADAP MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DARI MAKROFAG PENDERITA DAN INDIVIDU SEHAT BERISIKO TUBERKULOSIS PARU

Arlita Leniseptaria Antari, David Pakaya, Dahliatul Qosimah

INTRACELLULAR KILLING CAPACITY TO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS OF MACROPHAGES WERE OBTAINED FROM PULMONARY AND HEALTHY SUBJECTS' AT RISK FOR PULMONARY TUBERCULOSIS

### ABSTRACT

**Background:** Macrophages are the first defense mechanism in tuberculosis. The entry of *Mycobacterium tuberculosis* into the host macrophages and its survival in this environment are key components of tuberculosis pathogenesis. The aims of this study was to know whether there is any difference in intracellular killing capacity of *Mycobacterium tuberculosis* between macrophages obtained from pulmonary tuberculosis patients' and healthy subjects' at risk for pulmonary tuberculosis.

**Methods:** PBMC were isolated from buffy coat of pulmonary tuberculosis patients' and healthy subjects' at risk for pulmonary tuberculosis. Monocytes ( $10^5$  cell/ml) were cultured in 24-wells tissue culture plate that plated onto glass coverslip, then added RPMI 1640 supplemented with 10% HI-PHS (Heat Inactivated Pooled Human Serum) and incubated at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . At the end of that incubation periods, the cultures were harvested and washed with PBS. *Mycobacterium tuberculosis* befreed from that macrophages are then plated on solid media Middlebrook 7H10 and incubated during 7 days, 10 days and 14 days. Viable colonies of *Mycobacterium tuberculosis* were counted as CFU (Colony Forming Units).

**Results:** The result showed that the mean of viable colonies of *Mycobacterium tuberculosis* on solid media Middlebrook 7H10 after killing intracellular process are greater on pulmonary tuberculosis patients' macrophages than healthy subjects' at risk for pulmonary tuberculosis macrophages. The result of Univariate Analysis of Variance followed by F test at the level of 5% significance showed that the difference was very significant ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** The intracellular killing capacity of *Mycobacterium tuberculosis* from pulmonary tuberculosis patients' is lower than the intracellular killing capacity of *Mycobacterium tuberculosis* from healthy subjects' at risk for pulmonary tuberculosis, showed by the greater of the mean of viable colonies of *Mycobacterium tuberculosis* on solid media Middlebrook 7H10 from pulmonary tuberculosis patients' macrophages than healthy subjects' at risk for pulmonary tuberculosis macrophages.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, intracellular killing.

### ABSTRAK

**Latar belakang:** Makrofag merupakan sistem pertahanan yang pertama pada infeksi tuberkulosis, dimana masuknya *Mycobacterium tuberculosis* ke dalam makrofag dan kemampuan bertahan hidup didalamnya merupakan elemen kunci dari patogenesis tuberkulosis. Penelitian ini bertujuan untuk menguji perbedaan kemampuan intracellular killing terhadap *Mycobacterium tuberculosis* antara makrofag penderita dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru.

**Metode:** PBMC diisolasi dari buffy coat penderita dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru. Monosit ( $10^5$  cell/ml) dikultur dalam 24-wells tissue culture plate berisi coverslip, kemudian ditambahkan RPMI 1640 yang disuplementasi 10% HI-PHS (Heat Inactivated Pooled Human Serum) dan diinkubasi pada  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Pada akhir periode inkubasi, kultur dipanen, dibilas PBS, *Mycobacterium tuberculosis* yang terbebas kemudian dikultur dalam media padat Middlebrook 7H10 dan diinkubasi selama 7 hari, 10 haridan 14 hari. Koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang viabel dihitung sebagai CFU (Colony Forming Units).

**Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang viabel setelah intracellular killing lebih

<sup>1)</sup> Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNDIP

banyak terdapat pada makrofag penderita tuberkulosis paru daripada makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru. Hasil analisa dengan menggunakan uji *Univariate Analysis of Variance* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,01$ ).

**Simpulan:** *Intracellular killing* makrofag penderita tuberkulosis paru lebih rendah daripada individu sehat berisiko tuberkulosis paru. Hal tersebut ditunjukkan dengan lebih banyaknya jumlah koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang viabel pada media *Middlebrook 7H10* yang berasal dari makrofag penderita tuberkulosis paru.

**Kata kunci:** *Mycobacterium tuberculosis*, makrofag, *intracellular killing*.

## PENDAHULUAN

Tuberkulosis merupakan salah satu penyebab infeksi penting pada manusia dan masih menjadi masalah kesehatan dunia yang utama sampai saat ini.<sup>1-3</sup> Tuberkulosis dilaporkan WHO sampai saat ini masih merupakan pembunuh nomor satu diantara penyakit-penyakit infeksi di seluruh dunia, sekitar 3 juta penduduk dunia meninggal karena tuberkulosis setiap tahunnya.<sup>4,5</sup> Tuberkulosis merupakan penyakit infeksi kronik yang terutama menyerang makrofag alveolar paru. Penyakit ini menyerang hampir 75% populasi usia produktif (15-50 tahun), sehingga secara ekonomis merugikan suatu negara (Maher *et al.*, 1997). Meskipun prevalensi tuberkulosis dapat diturunkan dengan penggunaan beberapa antibiotik, namun sampai saat ini insiden dari penyakit tuberkulosis masih mengalami peningkatan.<sup>1,6</sup> Sekitar 90% individu yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* kebanyakan berakhir tanpa manifestasi klinis sakit tuberkulosis dan tidak menderita tuberkulosis seumur hidup mereka, akan tetapi bakteri dapat tetap hidup dalam paru dan dapat mengalami reaktivasi. Sekitar 2 miliar penduduk dunia diperkirakan sebagai penderita tuberkulosis laten, yang berarti bahwa individu-individu tersebut berisiko menjadi sakit sepanjang kehidupannya<sup>4,5</sup> meskipun mereka telah mendapatkan vaksin BCG pada masa anak-anak.<sup>7-10</sup> Sisanya, sekitar 10% akan menderita tuberkulosis, dan sekitar 5% dari populasi akan berkembang menjadi sakit tuberkulosis sepanjang hidupnya setelah terpapar. Sekitar 5% lainnya dalam beberapa dekade dapat terjadi pengaktifan kembali dari infeksi yang tersembunyi (reaktivasi).<sup>1,11-14</sup>

Masuknya *Mycobacterium tuberculosis* ke dalam makrofag dan kemampuannya bertahan hidup di dalamnya merupakan elemen kunci dari patogenesis tuberkulosis.<sup>15,16</sup> Pada infeksi primer terjadi suatu mekanisme yang kompleks, dimana *aerosol droplet nuclei* yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* terhirup dan mengendap

di permukaan sel epitel alveolar paru yang mengekspresi molekul adhesin (*Intracellular Adhesion Molecule-1/ICAM-1*), meningkatkan migrasi dan adhesi sel-sel fagosit, terutama makrofag alveolar yang sangat efektif memfagosit semua partikel termasuk *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>16,17</sup>

Respon imunologis oleh makrofag berupa fagositosis dan daya bunuh intraseluler yang berperan sebagai bentuk pertahanan tubuh pertama terhadap infeksi bakteri diharapkan dapat mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis* dan menurunkan insiden penyakit ini, akan tetapi pada kenyataannya, *Mycobacterium tuberculosis* mampu bermultiplikasi dalam makrofag sehingga menimbulkan penyakit tuberkulosis.<sup>18,19</sup>

*Mycobacterium tuberculosis* adalah patogen intraseluler pada manusia yang mampu menghindari atau bertahan dari proses daya bunuh intraseluler oleh makrofag. Bakteri tersebut masuk melalui proses fagositosis, kemudian hidup dan melangsungkan pertumbuhannya dalam sitoplasma makrofag.<sup>18,19</sup> Apabila *Mycobacterium tuberculosis* ini tetap bertahan hidup, maka respon hospes selanjutnya dimanifestasikan melalui pembentukan granuloma yang melokalisasi daerah infeksi.<sup>20-22</sup> *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai kemampuan hidup intraseluler dan mengatasi respon fagositik makrofag karena mempunyai komponen dinding sel yang terdiri dari lipid, karbohidrat dan protein kompleks (*mycolic acid*, LAM dan *phenolic glycolipid*) sehingga mampu menghambat fusi fagosom dan lisosom, menghambat asidifikasi dalam fagosom dan resisten terhadap ROI dan RNI.<sup>1,19,23</sup> Berdasarkan kenyataan hasil pengamatan di rumah sakit yang menunjukkan bahwa terdapat sekelompok individu yang terpapar *Mycobacterium tuberculosis* secara berulang-ulang, misalnya saja perawat di bagian paru dan para teknisi atau analis di laboratorium yang mengolah sampel dari penderita tuberkulosis paru tetapi mereka tetap sehat, tidak menunjukkan gejala tuberkulosis paru. Sementara

itu terdapat pula sekelompok individu lain yang terpapar *Mycobacterium tuberculosis*, yang menjadi sakit dan menunjukkan gejala tuberkulosis paru. Berdasarkan hasil pengamatan tersebut, maka timbul suatu pertanyaan apakah terdapat perbedaan respon imun antara kedua kelompok individu tersebut, yang dalam hal ini diwakili oleh proses daya bunuh intraseluler. Penelitian ini bertujuan untuk menguji perbedaan kemampuan *intracellular killing* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* antara makrofag penderita dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru.

## METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan penelitian *True Experimental Randomized Control Group Design*. Sampel adalah makrofag yang berasal dari penderita dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru dengan besar sampel yang digunakan adalah 7. Sedangkan jumlah makrofag yang digunakan untuk tiap pengulangan atau replikasi adalah 105 sel/ml.<sup>24,25</sup>

Preparasi Kultur Sel-sel Makrofag dari Darah Tepi Penderita dan Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis Paru (Isolasi PBMC/*Peripheral Blood Mononuclear Cells*).

Darah tepi penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru diambil dari darah vena cubiti secara aseptik sebanyak 20ml dituang ke dalam Erlenmeyer yang berisi 15–20 *glass bead* berdiameter 2mm (steril), dan kemudian dilakukan defibrinasi dengan cara mengocok memutar hati-hati selama 10 menit. Setelah ditambahkan 10 ml media RPMI 1640 (-) (media RPMI 1640 tanpa suplementasi HI-PHS/*Heat Inactivated Pooled Human Serum*) ke dalam Erlenmeyer, dipindahkan masing-masing 5ml lewat dinding tabung ke dalam tabung yang telah berisi 3ml *Ficoll-Histopaque*, kemudian disentrifuse 2000rpm selama 30 menit pada suhu 20°C menggunakan *sentrifuse swinging bucket rotor*.<sup>26,27</sup> *Buffy coat* dipindahkan ke dalam tabung steril, kemudian ditambahkan 10 ml larutan PBS steril dan disentrifuse 1000 rpm selama 10 menit pada suhu 20°C.<sup>26,28</sup> Supernatan dibuang, pelet dibilas dengan menggunakan 50µl larutan PBS sebanyak 3X, dan kemudian disentrifuse 1500rpm selama 10 menit pada suhu 20°C. Supernatan dibuang, pelet

disisakan dan ditambahkan dengan 4000µl media RPMI 1640 (+) (media RPMI 1640 yang telah disuplementasi dengan 10% serum manusia yang telah diinaktivasi dengan pemanasan 56°C selama 30 menit/HI-PHS/*Heat Inactivated Pooled Human Serum*), dan dilakukan mix pipetting. Viabilitas sel monosit ditentukan menggunakan *tryphan blue exclusion* ( $\geq 95\%$ ).<sup>29</sup> Persentase sel monosit ditentukan menggunakan pewarnaan Giemsa pada apusan sediaan hasil sentrifugasi pada 1500rpm selama 5 menit. Sel-sel monosit (105/ml) dikultur dalam *24-wells tissue culture plate* yang telah diletakkan *coverslip* di dalamnya dan kemudian ditambahkan medium RPMI 1640, pH 7,2, mengandung 25mM HEPES dan *L-glutamine* tanpa serum dan antibiotika.<sup>29</sup>

### Persiapan Maturasi Monosit menjadi Makrofag (*in vitro*)

Dimasukkan 4000µl suspensi sel monosit ke dalam 20 buah sumuran pada *24-wells plate tissue culture* (masing-masing berisi 200µl suspensi sel monosit) yang telah diletakkan *coverslip* berdiameter 15mm (*Nunc*) di dalamnya, dan ditambahkan  $\pm 500\mu\text{l}$  media RPMI 1640 (+), dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C yang mengandung 5% CO<sub>2</sub> selama 7 hari, dan kemudian dibilas dengan 50µl PBS steril sebanyak 5X. Sel monosit yang tidak melekat pada *coverslip* akan terbilas PBS, sedangkan sel makrofag akan tetap melekat pada *coverslip*. Pada sel makrofag tersebut (sel yang melekat pada *coverslip* dalam *24-wells tissue culture plate*) setiap hari dilakukan *feeding media* RPMI 1640 (+) dengancara menyedot dan membuang 500µl media RPMI 1640 (+) lama melalui tepi atas dan kemudian menggantinya dengan 500µl media RPMI 1640 (+) yang baru.<sup>30,31</sup>

### Oponisasi *Mycobacterium tuberculosis*

Satu ose platina (106 CFU/ml) *Mycobacterium tuberculosis strain* H37Rv ATCC 27294T (Sigma) dimasukkan secara aseptik dalam tabung *screw cap* berisi 4000µl media cair *Middlebrook 7H9* dan  $\pm 6-7$  buah *glass bead*, dan kemudian *divortex homogen*. Dipindahkan 4000µl, kemudian disentrifuse 3000rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet disisakan dan dibilas dengan 5000µl PBS steril sebanyak 3X. Pelet disisakan, kemudian ditambahkan dengan 4000µl media RPMI 1640 (-) dan 4000µl PHS/*Pooled Human*

*Serum*. Selanjutnya dilakukan sedot semprot sekitar 10X dengan spet tuberkulin 26G, dan diinkubasi pada suhu 37°C yang mengandung 5% CO<sub>2</sub> selama 20 menit, kemudian disentrifuse 3000rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet dibilas dengan 5000µl PBS steril sebanyak 3X, kemudian ditambahkan dengan 4000µl media RPMI 1640 (+).

### Ko-Kultur Makrofag dan *Mycobacterium tuberculosis*

Pada hari ke-7, ditambahkan 106CFU/ml suspensi *opsonized-Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv ATCC 27294T ke dalam kultur sel-sel makrofag, dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C yang mengandung 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam, 48 jam, 72 jam, 7 X 24 jam dan 14 X 24 jam.<sup>13,15,31-33</sup>

### Pengukuran Killing Intracelluler Makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis*

*Coverslip* pada dasar 24-wells tissue culture plate dibilas secara aseptik dengan PBS steril sebanyak 5X. Dasar *coverslip* dikerok memutar untuk panen makrofag, kemudian dikocok *mix pipetting*, diambil 200µl dan dipindahkan ke dalam tabung ependorf. Selanjutnya ditambahkan 800µl PBS steril, dan disentrifuse 1000 rpm selama 8 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet disisakan, ditambahkan 1000µl aquadest steril, diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 4°C, dan kemudian *divortex* selama 5 menit sehingga terjadi lisis makrofag dan *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler terbebas/keluar dari makrofag. Diambil 30µl, diteteskan pada media agar padat Middlebrook 7H10, dan diinkubasi pada suhu 37°C yang mengandung 5% CO<sub>2</sub> selama 7 hari, 10 hari dan 14 hari untuk mengetahui jumlah bakteri yang masih hidup, tidak didigesti oleh makrofag; dengan penghitungan koloni yang tumbuh per ml (CFU/ml).<sup>31</sup>

### Pengukuran CFU

Jumlah koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang masih dapat tumbuh pada media agar padat Middlebrook 7H10 dihitung sebagai CFU pada hari ke-7, ke-10 dan ke-14.

### Analisa Data

Pengamatan hasil penelitian dicatat, ditabulasikan dan dianalisis dengan menggunakan

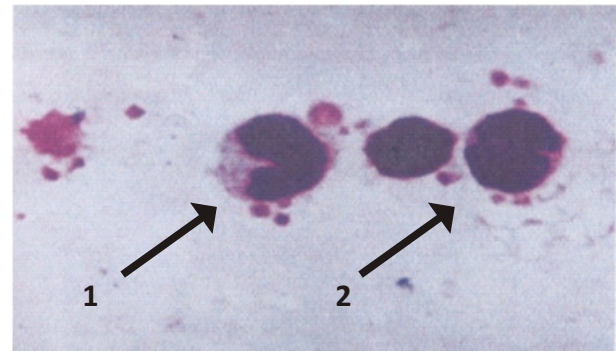
*Univariate Analysis of Variance* dan diikuti dengan uji F pada taraf nyata 5%. Hasil analisis yang bermakna dilanjutkan dengan uji LSD.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) dari Darah Vena

Sel-sel mononuklear ditemukan dalam lapisan *buffy coat* yang berada di antara lapisan atas (plasma) dan lapisan bawah (sedimen eritrosit dan granulosit). Isolasi PBMC pada penelitian ini secara keseluruhan menunjukkan viabilitas yang memenuhi kriteria pada uji *tryphan blue exclusion* (>95 %).

Hasil pewarnaan sediaan dari *buffy coat* menunjukkan bahwa dalam *buffy coat* yang digunakan pada penelitian ini, baik yang diperoleh dari penderita tuberkulosis paru ataupun dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru, terdapat sel mononuklear yang terdiri dari sel-sel monosit dan limfosit, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.

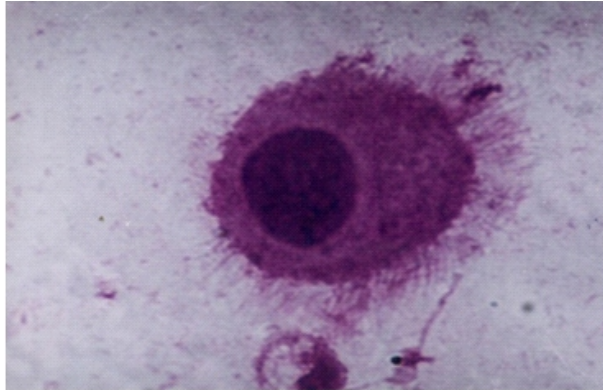


**Gambar 1.** Apusan sel-sel PBMC dari *buffy coat*. (1) Sel monosit tampak mempunyai inti berbentuk seperti ginjal. (2) Sel limfosit tampak mempunyai inti berbentuk bulat besar hampir menutupi seluruh sitoplasma.

### Maturasi Monosit menjadi Makrofag

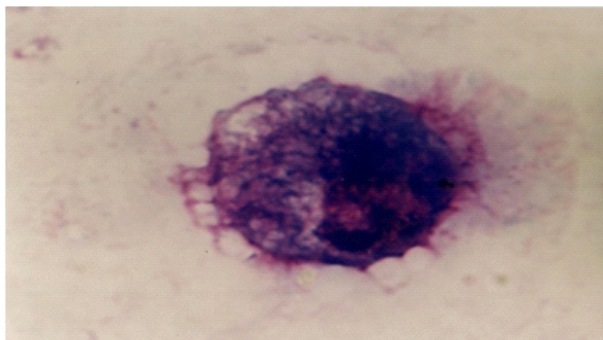
Pada kultur sel-sel makrofag yang berumur 7 hari tampak bahwa sel-sel makrofag kedua kelompok kultur makrofag dari penderita dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru, terlihat sel makrofag dengan ukuran yang besar, berbentuk bulat dengan tonjolan-tonjolan dinding sel dan sitoplasma yang besar. Selain itu juga tampak adanya perbedaan gambaran mikroskopis antara sel-sel makrofag yang berasal dari penderita

tuberkulosis paru dengan sel-sel makrofag yang berasal dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru. Perbedaannya dapat dilihat pada Gambar 2, dimana sel-sel makrofag penderita tuberkulosis paru mempunyai inti yang berbentuk bulat.



**Gambar2.** Sel makrofag penderita tuberkulosis paru pada masa inkubasi 7 hari dengan menggunakan mikroskop cahaya NIKON Eclipse E600, perbesaran1700X. Inti makrofag tampak berbentuk bulat.

Sedangkan pada pada Gambar 3, dapat diketahui bahwa sel makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru mempunyai inti yang berbentuk iregular dengan beberapa vakuola dan bentukan-bentukan padat di dalam sitoplasma.

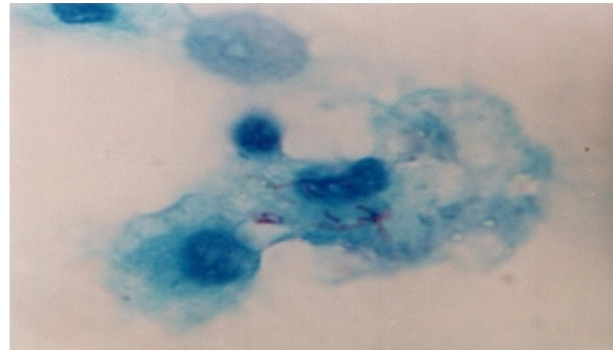


**Gambar3.** Sel makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru pada masa inkubasi 7 hari dengan menggunakan mikroskop cahaya NIKON Eclipse E600, perbesaran 1700X. Inti makrofag berbentuk iregular dengan beberapa vakuola dan bentukan-bentukan padat di dalam sitoplasma.

### Ko-Kultur Makrofag dan *Mycobacterium tuberculosis*

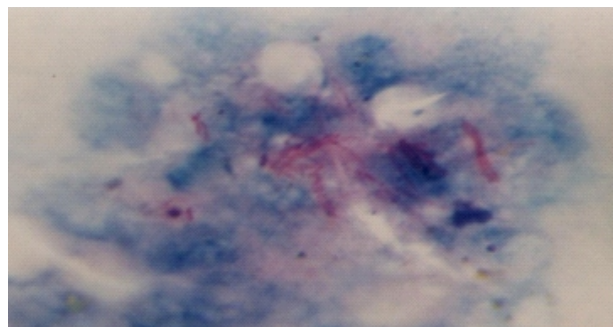
Gambar 4 menunjukkan adanya giant cell, makrofag dengan vakuola-vakuola dan beberapa bakteri tahan asam (berwarna merah) tampak berada di sekitar inti sel, kemungkinan besar di

dalam sitoplasma makrofag (difagosit) karena gambaran ini diperoleh melalui 3X pembilasan menggunakan PBS sebelum diwarnai. Dengan pembilasan menggunakan PBS, diharapkan *Mycobacterium tuberculosis* yang terletak ekstraseluler dapat terbilas dengan PBS.



**Gambar4.** Ko-kultur makrofag penderita tuberkulosis paru dan *Mycobacterium tuberculosis* dengan menggunakan mikroskop cahaya NIKON Eclipse E600, perbesaran 1700X. Beberapa bakteri tahan asam (berwarna merah) tampak berada di dalam sitoplasma makrofag (difagositosis).

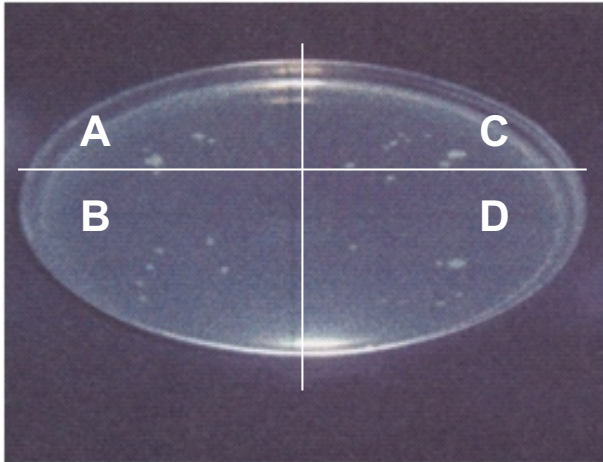
Sedangkan ko-kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru seperti pada Gambar 5 tampak adanya vakuola-vakuola pada sitoplasma dan bakteri tahan asam (berwarna merah) menyebar di sekitar inti sel, juga kemungkinan besar dalam sitoplasma makrofag. Beberapa makrofag tampak berkumpul mengelilingi *Mycobacterium tuberculosis* untuk membentuk *giant cell* (berwarna biru) dan kemungkinan besar yang juga memfagosit *Mycobacterium tuberculosis*.



**Gambar5.** Ko-kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru dan *Mycobacterium tuberculosis* dengan menggunakan mikroskop cahaya NIKON Eclipse E600, perbesaran 1700X. Beberapa makrofag tampak berkumpul untuk membentuk *giant cell* (berwarna biru) dan memfagositosis *Mycobacterium tuberculosis*.

### Uji Killing Intracellular Makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis*

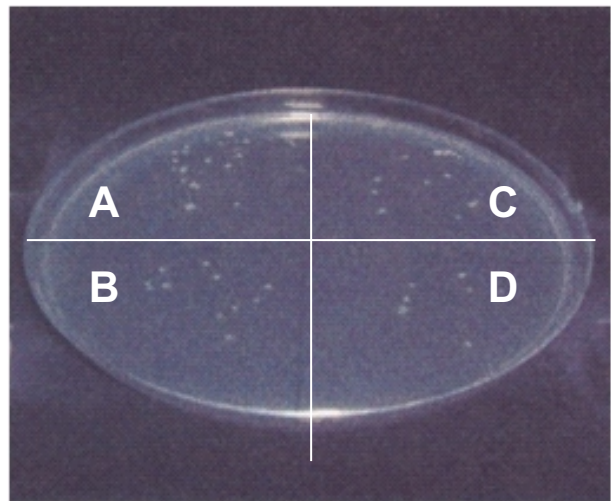
Gambar 6 menunjukkan hasil kultur *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pada media agar padat Middlebrook 7H10 setelah waktu inkubasi untuk proses *killing intracellular* selama 24 jam. Dua kuadran kiri (A dan B) merupakan pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang berasal dari ko-kultur makrofag penderita tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*, dimana masing-masing rata-rata jumlah pertumbuhan koloni sebanyak 6,5 CFU/ml (pada hari ke-7); 9,64 CFU/ml (pada hari ke-10) dan 13,43 CFU/ml (pada hari ke-14). Sedangkan pada dua kuadran kanan (C dan D) adalah pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* dari ko-kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*, dengan rata-rata jumlah pertumbuhan koloni sebanyak 3,22 CFU/ml (pada waktu inkubasi sub-kultur 7 hari); 6,36 CFU/ml (pada waktu inkubasi sub-kultur 10 hari) dan 9,93 CFU/ml (pada waktu inkubasi sub-kultur 14 hari).



**Gambar 6.** Hasil kultur *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pada media agar padat Middlebrook 7H10 setelah waktu inkubasi untuk proses *killing intraseluler* selama 24 jam. A dan B berasal dari ko-kultur makrofag penderita tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*. C dan D berasal dari ko-kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*.

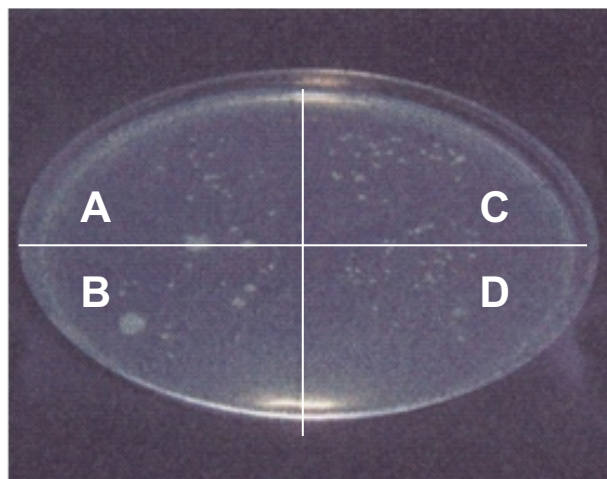
Penentuan *killing intracellular* *Mycobacterium tuberculosis* terhadap makrofag pada penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru selanjutnya tetap dilakukan

dengan waktu inkubasi untuk *killing intracellular* pada 48 jam, 72 jam, 7 X 24 jam dan 14 X 24 jam. Hasil lisis makrofag pada periode waktu inkubasi untuk *killing intracellular* tersebut kemudian dikultur pada masing-masing *petridish* yang dibagi menjadi empat kuadran, dimana pada dua kuadran kiri, yang diberi tanda A dan B, adalah merupakan pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang berasal dari ko-kultur makrofag penderita tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*, sedangkan pada dua kuadran kanan, yang diberi tanda C dan D, adalah pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* dari ko-kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*. Pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* juga diamati dan dihitung sebagai CFU/ml pada waktu inkubasi sub-kultur selama 7 hari, 10 hari dan 14 hari. Hasil pengamatan mikroskopisnya ditunjukkan pada Gambar 7 sampai dengan Gambar 10.

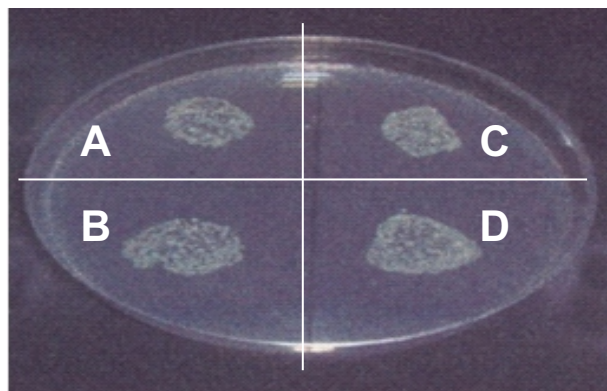


**Gambar 7.** Hasil kultur *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pada media agar padat Middlebrook 7H10 setelah waktu inkubasi untuk proses *killing intraseluler* selama 48 jam. A dan B berasal dari ko-kultur makrofag penderita tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*. C dan D berasal dari ko-kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*.

Pada pengamatan pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* pada media agar padat Middlebrook 7H10, koloni karakteristik *Mycobacterium tuberculosis* tampak berwarna krem, kasar dan kering seperti bunga kol dengan ukuran koloni kecil terpisah dan ada juga yang



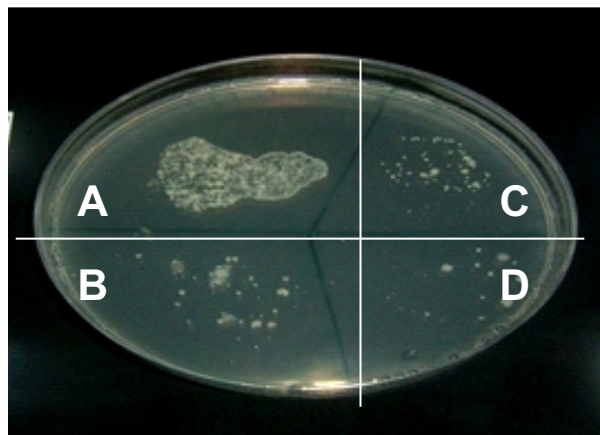
**Gambar 8.** Hasil kultur *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pada media agar padat Middlebrook 7H10 setelah waktu inkubasi untuk proses killing intraseluler selama 72 jam. A dan B berasal dari ko-kultur makrofag penderita tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*. C dan D berasal dari ko-kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*.



**Gambar 9.** Hasil kultur *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pada media agar padat Middlebrook 7H10 setelah waktu inkubasi untuk proses killing intraseluler selama 7 X 24 jam. A dan B berasal dari ko-kultur makrofag penderita tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*. C dan D berasal dari ko-kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*.

bergerombol. Dapat diketahui pula bahwa jumlah pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* pada kuadran kiri (A dan B) lebih banyak jika dibandingkan dengan rata-rata pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* pada kuadran kanan (C dan D). Hal tersebut mungkin karena *killing intracellular* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dari makrofag penderita tuberkulosis

paru lebih rendah jika dibandingkan dengan *killing intracellular* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dari makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru.

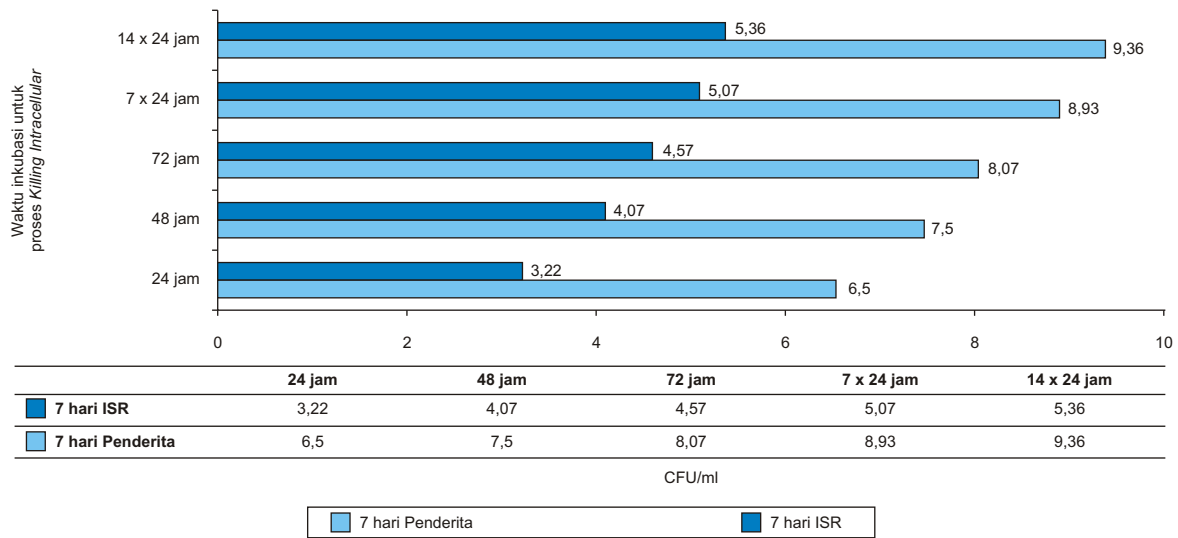


**Gambar 10.** Hasil kultur *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pada media agar padat Middlebrook 7H10 setelah waktu inkubasi untuk proses killing intraseluler selama 14 X 24 jam. A dan B berasal dari ko-kultur makrofag penderita tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*. C dan D berasal dari ko-kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru dengan *Mycobacterium tuberculosis*.

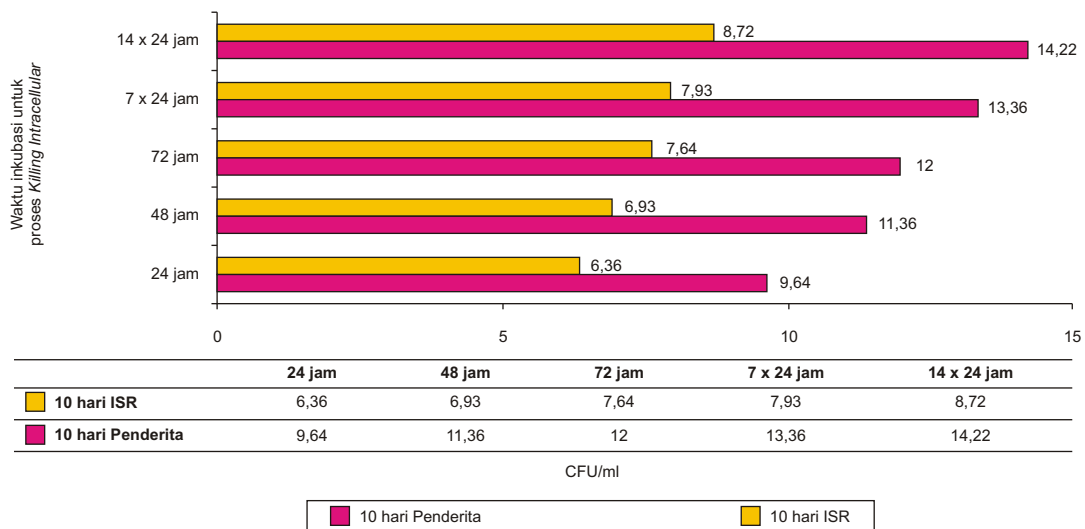
Pada pengamatan pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* pada media agar padat Middlebrook 7H10, koloni karakteristik *Mycobacterium tuberculosis* tampak berwarna krem, kasar dan kering seperti bunga kol dengan ukuran koloni kecil terpisah dan ada juga yang bergerombol. Dapat diketahui pula bahwa jumlah pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* pada kuadran kiri (A dan B) lebih banyak jika dibandingkan dengan rata-rata pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* pada kuadran kanan (C dan D). Hal tersebut mungkin karena *killing intracellular* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dari makrofag penderita tuberkulosis paru lebih rendah jika dibandingkan dengan *killing intracellular* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dari makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru.

#### Uji Hitung Koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang Viabel

Hasil uji hitung jumlah koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang masih dapat tumbuh (*viable*) pada media agar padat Middlebrook 7H10 setelah *killing*



**Gambar11.** Hasil rata-rata uji *killing intracellular* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dari makrofag penderita dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru pada waktu inkubasi sub-kultur 7 hari. Penderita = Penderita Tuberkulosis Paru; ISR = Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis Paru.



**Gambar12.** Hasil rata-rata uji *killing intracellular* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dari makrofag penderita dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru pada waktu inkubasi sub-kultur 10 hari. Penderita = Penderita Tuberkulosis Paru; ISR = Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis Paru.

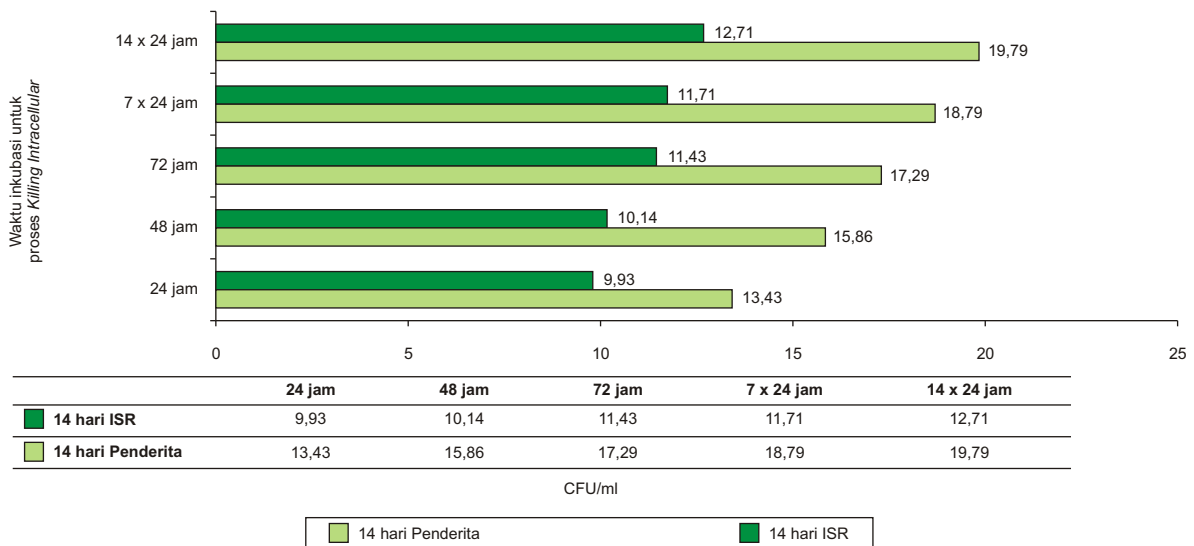
*intracellular* dalam makrofag penderita dan makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru dapat dilihat pada Gambar 11 sampai dengan Gambar13.

Semakin lama waktu inkubasi untuk *killing intracellular*, dapat menyebabkan semakin bertambahnya jumlah rata-rata koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang masih dapat

tumbuh pada media agar padat Middlebrook 7H10. Hal tersebut tidak hanya terjadi pada makrofag penderita tuberkulosis paru, tetapi juga terjadi pada makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru.

Jumlah rata-rata koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang masih dapat tumbuh pada media agar padat Middlebrook 7H10 setelah *killing*





**Gambar13.** Hasil rata-rata uji *killing intracellular* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dari makrofag penderita dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru pada waktu inkubasi sub-kultur 14 hari. Penderita = Penderita Tuberkulosis Paru; ISR = Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis Paru.

*intracellular* makrofag penderita tuberkulosis paru lebih banyak jika dibandingkan dengan jumlah rata-rata koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang masih dapat tumbuh pada media agar padat *Middlebrook 7H10* setelah *killing intracellular* makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kemampuan daya bunuh intraseluler terhadap *Mycobacterium tuberculosis* yang terjadi pada makrofag penderita tuberkulosis paru lebih rendah jika dibandingkan dengan kemampuan daya bunuh intraseluler terhadap *Mycobacterium tuberculosis* yang terjadi pada makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru. Rendahnya kemampuan *killing intracellular* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* yang terjadi pada makrofag penderita tuberkulosis paru kemungkinan disebabkan karena makrofag kurang efisien dalam melakukan *killing intracellular* terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Hal tersebut berkaitan dengan strategi unik dan khas dari *Mycobacterium tuberculosis* untuk menghindari dan bertahan terhadap proses fagositosis dan *killing intracellular* makrofag. Selain itu, *Mycobacterium tuberculosis* juga dapat bersifat resisten terhadap *killing intracellular*, bertahan hidup (*survive*), tetap bermultiplikasi selama berada dalam makrofag bahkan melakukan *killing* terhadap makrofag.

Sedangkan jumlah rata-rata koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang masih dapat tumbuh pada media agar padat *Middlebrook 7H10* setelah *killing intracellular* makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru mempunyai jumlah yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan jumlah rata-rata koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang masih dapat tumbuh pada media agar padat *Middlebrook 7H10* setelah *killing intracellular* makrofag penderita tuberkulosis paru. Dalam hal ini, kemungkinan makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru masih lebih efisien dalam melakukan *killing intracellular* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* daripada makrofag penderita tuberkulosis paru.

Hasil uji F menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan antara jumlah rata-rata koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang masih dapat tumbuh pada media agar padat *Middlebrook 7H10* pada waktu inkubasi sub-kultur 7 hari dalam makrofag penderita tuberkulosis paru dan makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru.

## SIMPULAN

Kemampuan *killing intracellular* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* pada makrofag

penderita tuberkulosis paru lebih rendah 1.35 kali sampai 2.02 kali daripada makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru; ditunjukkan dengan jumlah rata-rata koloni yang masih dapat tumbuh pada media agar padat *Middlebrook 7H10* dari makrofag penderita tuberkulosis paru lebih besar daripada jumlah rata-rata koloni yang masih dapat tumbuh pada media agar padat *Middlebrook 7H10* dari makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru.

Perlu dilakukan studi *in vitro* untuk mengetahui perkembangan perbedaan kemampuan daya bunuh intraseluler terhadap *Mycobacterium tuberculosis* antara makrofag penderita tuberkulosis paru dan makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru dalam kurun waktu inkubasi sebelum 24 jam dan perlu dilakukan studi *in vivo* pada hewan coba dengan menggunakan berbagai faktor yang berinteraksi secara kompleks terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* yang berpengaruh terhadap *killing intracellular*.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AKL., Andrew H. and Pober JS., 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4<sup>th</sup> Edition. Philadelphia : WB. Saunders Company. pp.352-354.
- Parslow TG. *et al.*, 2001. Natural Immunity. In Medical Immunology. 10<sup>th</sup> Edition. USA : Lange Medical Books/Mc Graw-Hill Medical Publishing Division.
- Kaufmann SHE., 2002. Protection Against Tuberculosis : Cytokines, T Cells and Macrophage. *Ann Rheum Dis* 61 (Suppl II) : ii 54- ii 68.
- Frieden TR., Sterling TR., Munsiffss, Watt CJ. and Dye C., 2003. Tuberculosis. *Lancet*. 362: 887-899.
- Philip WBS., 2003. Laboratory Role in Tuberculosis Control. *Wisconsin Med. J.* 102(6) : 31-34.
- Brown E., 2000. TB Genome. <http://www.brown.edu/Research/TB-HIV/Lab/tb/tbintro.html>.
- Tala-Heikkila MM., Juhani ET. and Eero OJT., 1998. Bacilli Calmete-Guerin Revaccination Questionable with Low Tuberculosis Incidence. Department of Paediatrics, Turku University Central Hospital. Finland.
- Kaufmann SHE., 2001. How Can Immunology Contribute to the Control of Tuberculosis ?. Max-Planck Institute for Infection of Immunology. Berlin. Germany.
- Flynn JL., 2004. Immunology of Tuberculosis and Implications in Vaccine Development. Department of Molecular Genetics and Biochemistry, University of Pittsburgh School of Medicine. USA.
- Waknine Y., 2004. BCG Vaccine Efficacy Persists for 50 to 60 Years. *Medscape Medical*. <http://www.medscape.com/viewarticle/475012>.
- Ferebee SH., 1969. Controlled Chemoprophylaxis Trials in Tuberculosis. A General Review. *Adv Tuberc Res.* 32: 42-47.
- Crevel RV., Ottenhorf THM. and Vander Meer JWM., 2002. Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. p. 294-309. vol 15. no. 2.
- Schorey *et al.*, 2002. A Macrophage Invasion Mechanism of Pathogenic Mycobacteria. <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/277/5329/1091>
- Shin. 2002. Immune Evasion by Mycobacterium tuberculosis. *Current Opinion in Immunology*. 15: 450.
- DesJardin L., Kaufman TM., Potts B., Kutzbach B., Hong YI. and Schlesinger LS., 2002. Mycobacterium tuberculosis-infected Human Macrophages Exhibit Enhanced Cellular Adhesion with Increased Expression of LFA-1 and ICAM-1 and Reduced Expression and/or Function of Complement Receptors, FcγRII and the Mannose Receptor. *Veterans Admin. Med. Center and Depts of Medicine, Microbiology and the Interdisciplinary Immunology Program. University of Iowa. Iowa City. IA. USA.*
- Lucy *et al.*, 2002. Mycobacterium tuberculosis-Infected Human Macrophages Exhibit Enhanced Cellular Adhesion with Increased Expression of LFA-1 and ICAM-1 and Reduced Expression and/or Function of Complement Receptors, FcγRII and the Mannose Receptor. *Microbiology* 148: 3161-3171.
- Ernst JD., 1998. Macrophage Receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.* Vol. 66 No. 4.
- Betjes MGH., Havenith CEG., Loosdrecht AA. and Beelen RHJ., 1994. Methods for Studying Immuno-Effector Function and Antigen Presenting Activity of Human Macrophages. *J. Immun Meth* 174.
- Roitt IJ., Brostoff and Male D., 2001. Immunology. 6<sup>th</sup> Edition. London : Harcourt Publisher Ltd. pp. 8.1 15.20-15.22.
- Bellanti JA. and Robbins JB., 1993. Imunoterapi. Dalam (Bellanti JA, ed) *Imunologi III*. (Wahab SA). Yogyakarta : Gajah Mada University Press.
- Rom WN. and Garay S., 2001. Pulmonary Tuberculosis : Cellular Mediated Immunity. 2<sup>nd</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Ulrichs T. and Kaufmann SHE., 2004. Cell-Mediated Immune Response. In : Tuberculosis. Rom WN. and Garay S. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 251-334.
- Dao DN. *et al.*, 2003. Mycobacterium tuberculosis Lipomannan Inducer Apoptosis and IL-12 Production in Macrophages. *Dalam Infection and Immunity Journals*. Vol 72 no. 4 p 2067-2074.
- Li Y., Petrofsky and Bermudez LE., 2002. Mycobacterium tuberculosis Uptake by Recipient Host Macrophages Influenced by Environmental Conditions in the Granuloma of the Infectious Individual and is Associated with Impaired Production of Interleukin-12 and Tumor Necrosis Factor Alpha. *Infection and Immunity* : 6223-6230.
- Zhang M. *et al.*, 1998. Growth of Virulent and Avirulent Mycobacterium tuberculosis Strains in Human Macrophage. *Infection and Immunity* : 794-799.
- Gessani S., Laura F., Patrizia P. and Filippo B., 2000. Purification of Macrophages. *Laboratory of Virology, Istituto Superiore di Sanita, Viale Regina Elena. Rome. Italy.*
- Paulnock DM., 2000. Macrophages : A Practical Approach. USA. Oxford University Press.
- Leijh PCJ., Van Furth R. and Van Zwet TL., 1986. In Vitro Determination of Phagocytosis and Intracellular Killing by Polymorphonuclear and Mononuclear Phagocytes. In (Weit

- et al.*, eds). Handbook of Experimental Immunology in Four Volumes. Vol 2 : Cellular Immunology. Oxford : Blackwell Scientific Publications. pp. 46.1–46.18.
29. Zabaleta *et al.*, 1998. Diminished Adherence and/or Ingestion of Virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Monocyte-Derived Macrophages from Patients with Tuberculosis. Clin. Diag. Lab. Immun. Vol. 5 No. 5.
  30. Nan GJ. *et al.*, 2002. Human Macrophage Activation Programs Induced by Bacterial Pathogens.
  31. Portales-Perez DP. *et al.*, 2002. Comparative and Prospective Study of Different Immune Parameters in Healthy Subjects at Risk for Tuberculosis and in Tuberculosis Patients. Clin. Diag. Lab. Immun. Vol. 8 No. 2.
  32. Bishayi B. *et al.*, 2000. Sodium Arsenite Induced Alteration in Functional Activity of Murine Peritoneal Macrophages. Indian. Journal of Pharmacology 32 : 192–197.
  33. Vishwanath V., Narayanan S. and Narayanan PR., 1998. The Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in Activated Human Macrophages. Tuberculosis Research Centre. Mayor VR. Ramanathan Road, Chetput, Chennai 600031. India.

